REF 43735	ZENIT RA GBM	Distribué par
INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION	IVD +2°C +8°C Σ 50	CE

UTILISATION PREVUE

Le test *ZENIT RA GBM* est un test immunologique chimioluminescent (CLIA) pour la détermination quantitative, avec l'appareil *ZENIT RA Analyser*, des anticorps spécifiques de classe IgG dirigés contre la Membrane Basale Glomérulaire (Glomerular Basal Membrane ou GBM), dans des échantillons de sérum ou de plasma humain (EDTA, Citrate de Sodium).
Ce dosage est utilisé comme auxiliaire de diagnostic dans l'évaluation du syndrome de Goodpasture et pour le diagnostic différentiel des vasculites.
ATTENTION: Toute décision médicale ne peut pas être basée uniquement sur le résultat de ce seul test, mais doit être fondée sur l'évaluation de l'ensemble de toutes les données cliniques et de laboratoire disponibles.

SIGNIFICATION CLINIQUE

Les anticorps anti-membrane basale glomérulaire (anti-GBM) sont le *marker* sérologique d'une maladie auto-immunitaire rare caractérisée cliniquement par la présence d'une glomérulonéphrite à progression rapide et histologiquement par une glomérulonéphrite nécrosante extracapillaire avec immunofluorescence linéaire (glomérulonéphrite d'anticorps anti-GBM). Quand est présent de façon contemporaine un intéressement pulmonaire (alvéolite hémorragique), elle prend le nom de syndrome de Goodpasture (GP) [1].
Le rôle pathogénique des anticorps est certain, en effet le dommage tissulaire se fait au travers des anticorps anti-GBM à la membrane basale glomérulaire (et alvéolaire)[2].
L'auto-antigène cible a été identifié dans le domaine non collagénasique (NC1) sur la chaîne α3 du collagène de type IV présent uniquement dans les membranes basales du rein, du poumon, du limaçon et de l'oeil[3].
Le syndrome de Goodpasture est une maladie très grave qui, en absence d'un traitement rapide et adapté, a une évolution souvent fulminante[4]. Malgré les progrès thérapeutiques, la survie du patient et des organes dépend encore étroitement du degré d'insuffisance rénale à la présentation, le diagnostic précoce est donc essentiel pour la survie du patient et la récupération de la fonction rénale.
Le diagnostic de maladie par les anticorps anti-GBM ou de GP est basé sur la démonstration, à travers une méthode d'immunofluorescence directe par biopsie rénale, de dépôts linéaires d'immunoglobulines sur la membrane basale glomérulaire. Toutefois, dans de nombreuses situations, la biopsie rénale ne peut être effectuée ou doit être renvoyée, le diagnostic sérologique a donc un rôle fondamental. Les anti-GBM circulants peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte sur le rein de primate; la méthode est caractérisée de hautement spécifique mais de sensibilité non adaptée[5]. Des méthodes de détermination

immunométriques sont maintenant disponibles, quantitatives et spécifiques aux antigènes, basées sur des méthodes ELISA, fluoroimmunoenzymatiques et de chimioluminescence qui utilisent la GBM entière solubilisée, la chaîne α3(IV) du collagène et, plus récemment, l'antigène de GP sous forme recombinante humaine[6]. La sensibilité diagnostique des *tests* spécifiques aux antigènes est très élevée, entre 94.7 et 100%, tandis que la spécificité envers les contrôles pathologiques varie de 90.9 à 100%[6]. Des données très récentes confirment que, malgré les excellentes *performances* diagnostiques des méthodes, chez environ 5% des patients affectés par la maladie par anticorps anti-GBM / syndrome de Goodpasture, les auto-anticorps circulants ne sont pas détectables[7].

De par son importante signification clinique et par ses valeurs de prédiction élevées, la recherche des anticorps anti-GBM est indiquée dans l'encadrement diagnostic de patients avec cadres cliniques d'insuffisance rénale d'origine inconnue avec microhématurie, en particulier dans les cas à progression rapide. Le titre des anticorps anti-GBM circulants est d'utilité prognostique[8].

En présence d'un syndrome rein-poumon, les anticorps anti-GBM peuvent être détectés chez environ un tiers des patients.

Les anticorps anti-GBM sont directement responsables du dommage à l'organe, le suivi est donc considéré très utile pour guider le traitement, en particulier de plasmaphérèse. La négativité persistante pour les anti-GBM est une condition indispensable pour les patients en attente d'une greffe rénale, pour réduire au minimum la possibilité que la maladie puisse se représenter dans l'organe transplanté.

Comme les vasculites systémiques associées aux ANCA peuvent apparaître avec un cadre clinique de GN rapidement progressif, il est utile d'effectuer, en même temps que la recherche des anti-GBM, la recherche des ANCA. Il est bon de rappeler que dans un pourcentage significatif de patients avec anti-GBM (10-38%), des ANCA sont présents de façon contemporaine, généralement avec spécificité pour la myéloperoxydase (ANCA-MPO), dont la signification clinique n'est pas claire[6,9,10]. Un cadre de GNRP peut toutefois être secondaire à des pathologies systémiques du tissu conjonctif ou des infections.

En relation à l'utilité diagnostique de la donnée de laboratoire, il est utile de rappeler que les valeurs de prédiction positif et négatif (VPP, VPN) dépendent, en plus de la sensibilité et de la spécificité du *test*, de la prévalence de la maladie dans la population examinée. Une demande appropriée (probabilité élevée de pré-*test*) permet d'obtenir un résultat de réelle utilité clinique et réduit de façon significative la possibilité de résultats faussement positifs.

PRINCIPE DE LA METHODE

Le kit *ZENIT RA GBM* pour la détermination quantitative des IgG spécifiques anti-membrane basale glomérulaire, utilise une méthode immunologique indirecte à deux étapes basée sur le principe de la chimioluminescence.

L'antigène hautement purifié NC1α3(IV) est utilisé pour revêtir les particules magnétiques (phase solide) et un anticorps anti-IgG humaines est marqué avec un dérivé de l'ester d'acridinium (conjugué).

Durant la première incubation, les anticorps spécifiques se trouvant dans l'échantillon, dans les étalons ou dans les contrôles se lient à la phase solide.

Durant la deuxième incubation, le conjugué réagit avec les anticorps anti-GBM séquestrés par la phase solide. Après chaque incubation, le matériel non lié à la phase solide est enlevé par aspiration et lavage successif.

La quantité de conjugué marqué qui reste lié à la phase solide est évaluée à travers activation de la réaction de chimioluminescence et mesure du signal lumineux. Le signal généré, exprimé en unités relatives de lumière (RLU, Relative Light Unit), est indicatif de la concentration en anticorps spécifiques se trouvant dans l'échantillon, dans les étalons et dans les contrôles.

AUTOMATISATION

L'appareil *ZENIT RA Analyser* réalise en automatique toutes les opérations prévues par le protocole de dosage: ajout dans le récipient de réaction des échantillons, étalons, contrôles, particules magnétiques, conjugué et solutions d'activation de la chimioluminescence; séparation magnétique et lavage des particules; mesure de la lumière émise.
Le système calcule les résultats du dosage pour les échantillons et les contrôles à travers une courbe de calibration mémorisée et imprime un rapport qui inclut toutes les informations relatives au dosage et au patient.

MATERIEL ET REACTIFS

Matériel et réactifs fournis

REAG	1	MP	2.5 mL

Particules magnétiques revêtues de l'antigène hautement purifié NC1α3(IV) dans un Tampon Phosphaté contenant des protéines stabilisantes, un tensioactif, Pro-Clin 300 et azide de sodium (< 0,1 %) comme conservateurs.

REAG	2	CONJ	15 mL

Anticorps monoclonal de rat anti-IgG humaine marqué avec un dérivé de l'ester d'acridinium (conjugué), dans un Tampon Phosphaté contenant des protéines stabilisantes et de l'azide de sodium (< 0,1 %) comme conservateur.

REAG	3	DIL	25 mL

Solution Diluant Echantillons: Tampon Phosphaté contenant de l'albumine de sérum bovin, un tensioactif, un colorant bleu et de l'azide de sodium (<0,1%) comme conservateur.

REAG	4	CAL A	1.6 mL

Sérum humain avec faible concentration en anticorps anti-GBM IgG dans un Tampon Phosphaté contenant de l'albumine de sérum bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, Pro-Clin 300 et sulfate de gentamicine comme conservateurs.

REAG	5	CAL B	1.6 mL

Sérum humain avec concentration élevée en anticorps anti-GBM IgG dans un Tampon Phosphaté contenant de l'albumine de sérum bovin, un tensioactif, un colorant bleu inerte, Pro-Clin 300 et sulfate de gentamicine comme conservateurs.

Tous les réactifs sont prêts à l'usage.
Les réactifs 1, 2 et 3 sont assemblés en un ensemble unique qui constituent la cartouche réactifs.
Les concentrations des Etalons sont exprimées en UA/mL (Unités Arbitraires) et tarées par rapport à un standard de référence interne. Les valeurs des concentrations, spécifiques par lot de produit, sont enregistrées dans le DATA DISK inséré dans le kit.

DATA DISK

Mini-DVD contenant les informations concernant tous les produits de la Ligne ZENIT RA (Réactifs, Etalons, Sérums de contrôle) mises à jour au dernier lot de production avec l'exclusion des produits périmés à la date de compilation du nouveau DATA DISK.
Il suffit de conserver le DATA DISK avec le numéro de lot le plus élevé pour maintenir les informations requises à jour pour le fonctionnement correct du système.

Matériels et réactifs nécessaires mais non fournis dans le kit

- ZENIT RA Analyzer — Réf. No. 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube * — Réf. No. 41402
  Boîte de 960 cuvettes.
- ZENIT RA System Liquid * — Réf. No. 41409
  1 bouteille de 5 litres de solution prête à l'emploi.
- ZENIT RA Wash Solution * — Réf. No. 41407
  1 bouteille de 10 litres de solution prête à l'emploi.
- ZENIT RA Trigger Set * — Réf. No. 41403
  1 bouteille de 250 ml de Trigger A (solution de pré-activation)
  1 bouteille de 250 ml de Trigger B (solution d'activation)
- ZENIT RA D-SORB Solution — Réf. No. 41436
  Pack de 2 bouteilles de 1 litre de solution prête à l'emploi.
- ZENIT RA Cartridge Checking System * — Réf. No. 41401

- ZENIT RA Top Cap Set Réf. No. 41566
  300 bouchons supérieurs rouges pour fermer les récipients des calibrateurs après la première utilisation.

(*) L'appareil ZENIT RA et les accessoires identifiés par l'astérisque sont fabriqués par Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Belgique et distribués par A. Menarini Diagnostics Srl.

Autres Réactifs Recommandés

SET DE CONTROLE ANCA/GBM ZENIT RA N° Code 41449
3 flacons de 1.5 mL de sérum humain négatif et 3 flacons de 1.5 mL de sérum humain positif aux anticorps anti-GBM.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

Les réactifs fournis dans le kit *ZENIT RA GBM* sont uniquement destinés à un usage diagnostic in vitro et non pour usage in vivo chez l'homme ou l'animal.
Ce produit doit être utilisé par des utilisateurs professionnels en étroite observance des instructions reportées dans ce document.

La société Menarini ne peut être tenue responsable de pertes ou dommages générés par un usage non conforme aux prescriptions fournies.

Précautions de sécurité
Ce produit contient du matériel d'origine animale et doit donc être manipulé comme s'il contenait des agents infectieux.
Ce produit contient des composants d'origine humaine. Toutes les unités de sérum ou plasma utilisées pour la fabrication des réactifs de ce kit ont été analysées avec des méthodes approuvées par la FDA et ont résulté non réactives pour la présence de HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 et anti-HIV2.
Toutefois, comme aucune méthode d'analyse n'est capable de garantir l'absence d'agents pathogènes, tout le matériel d'origine humaine doit être considéré potentiellement infecté et manipulé comme tel.
En cas d'emballage endommagé avec sortie des réactifs, effectuer la décontamination de la zone intéressée avec une solution diluée d'Hypochlorite de Soude après s'être protégé avec des dispositifs de protection individuelle adaptés (tabliers, gants, lunettes).
Effectuer l'élimination du matériel utilisé pour le nettoyage et des déchets d'emballage touchés par les réactifs, sur base des normes nationales pour l'élimination des déchets potentiellement infectieux.
Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Etant donné que l'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre et le laiton plombé en formant des azides explosives dans les tuyauteries, il est recommandé de ne pas éliminer des réactifs ou des déchets dans les égouts mais de suivre les normes nationales en matière d'évacuation de déchets potentiellement dangereux.

Précautions de manipulation

Pour obtenir des résultats fiables, il est nécessaire de s'en tenir étroitement à ces Instructions pour l'utilisation et de suivre scrupuleusement ce qui est indiqué dans le manuel de fonctionnement de l'appareil.
Les réactifs fournis dans le kit doivent être utilisés exclusivement avec le système *ZENIT RA Analyzer*.
Les composants de la cartouche réactifs ne peuvent être enlevés de la cartouche et réassemblés.
Ne pas utiliser le kit au-delà de la date de péremption.

PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs fournis dans le kit sont tous prêts à l'usage.

CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs fournis dans le kit à 2-8 °C en position verticale et à l'obscurité.
Dans ces conditions, la cartouche réactifs et les étalons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption.
La cartouche réactifs peut être utilisée après ouverture pendant 60 jours si conservée dans un frigo à 2-8 °C ou bien dans l'appareil.
Les étalons peuvent être utilisés après ouverture pendant 60 jours si conservés dans un frigo à 2-8 °C et si la permanence à bord ne dépasse pas les 6 heures par séance.
Ne pas congeler les réactifs et les étalons.

PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Le dosage doit être effectué sur des échantillons humains de sérum et de plasma (EDTA – Citrate de Sodium).
Il est déconseillé d'utiliser des échantillons lipémiques, hémolysés et troubles.
Si le dosage est effectué après plus de 8 heures, séparer le sérum et le plasma du coagulat, des globules rouges et des éprouvettes de séparation avec du gel.
Avant d'être analysés, les échantillons peuvent être conservés dans un frigo à 2-8 °C pendant 7 jours au maximum.
Si le dosage est effectué après plus de 7 jours, conserver les échantillons congelés (< - 20 °C).
Eviter les congélations et les décongélations répétées.

PROCEDURE DE FONCTIONNEMENT

Pour obtenir des prestations analytiques fiables, s'en tenir scrupuleusement aux instructions reportées dans le manuel de fonctionnement de l'appareil.

Chargement des réactifs

Tous les réactifs fournis dans le kit sont prêts à l'usage.

Avant d'insérer la cartouche réactifs dans le système, le récipient des particules magnétiques doit être agité horizontalement par rotation de façon à favoriser la remise en suspension des particules. Effectuer l'opération en évitant la formation de mousse.

Placer la cartouche réactifs dans la zone réactifs de l'appareil en utilisant le guide spécial et laisser en agitation pendant au moins 60 minutes avant l'usage.

Le positionnement de la cartouche réactifs détermine en même temps la lecture du code à barres d'identification. En cas d'endommagement de l'étiquette de la cartouche ou en cas d'absence de lecture, les données d'identification peuvent être saisies manuellement.

L'appareil maintient automatiquement en agitation continue les particules magnétiques.

Si la cartouche réactifs est enlevée de l'appareil, la conserver verticalement à l'obscurité à 2-8 °C.

Chargement des étalons

Les étalons ZENIT RA sont prêts à l'usage. Laisser les étalons à température ambiante pendant 10 minutes et agiter délicatement le contenu, manuellement ou par vortex, en évitant la formation de mousse.

Dans le cas où les étalons sont utilisés pour la première fois, éliminer le sceau de garantie et le capuchon blanc de fermeture avant leur insertion dans l'appareil.

Dans le cas où les étalons ont déjà été utilisés, le récipient sera équipé du capuchon supérieur (capuchon rouge) sans le sceau de garantie. Eliminer le capuchon de fermeture rouge avant leur première insertion dans l'appareil.

Insérer les étalons dans l'appareil dans la zone échantillons; pour leur identification dans l'appareil, consulter le manuel d'utilisation de l'appareil. Les données du code à barres doivent être insérées manuellement en cas d'endommagement de l'étiquette ou en cas d'absence de lecture.

Les valeurs de la concentration en anticorps IgG anti-GBM se trouvant dans les étalons sont enregistrées dans le DATA DISK et automatiquement transférées à l'analyseur.

A la fin de la séance, les récipients des étalons doivent être fermés avec les capuchons supérieurs prévus (capuchons rouges) et transférés à 2-8 °C jusqu'à leur utilisation successive.

Les étalons peuvent être utilisés au maximum quatre fois.

Chargement des contrôles

Insérer les contrôles dans la zone échantillons de l'appareil. Pour leur identification dans l'appareil, consulter le manuel d'utilisation de l'appareil. En cas d'absence de code à barres sur le contrôle ou en cas d'absence de lecture, les données d'identification du contrôle peuvent être insérées manuellement. Lorsque l'on utilise les Contrôles Zenit RA, consulter les instructions d'utilisation relatives. Les valeurs de la concentration en anticorps IgG anti-GBM se trouvant dans les contrôles sont enregistrées dans le DATA DISK et automatiquement transférées à l'analyseur. Sélectionner pour chaque contrôle les paramètres requis.

Chargement des échantillons

Insérer les échantillons dans l'appareil, dans la zone échantillons. Pour leur identification dans l'appareil, consulter le manuel d'utilisation de l'appareil. En cas d'absence de code à barres sur l'échantillon ou en cas d'absence de lecture, les données d'identification de l'échantillon peuvent être insérées manuellement.
Sélectionner pour chaque échantillon les paramètres requis.

Calibration

L'appareil *ZENIT RA Analyzer* utilise une courbe de calibration mémorisée (master curve), générée par le producteur pour chaque lot de cartouche réactifs.
Les paramètres des "master curve", ainsi que les valeurs des concentrations des étalons, sont mémorisés dans le DATA DISK et transférés dans la banque de données de l'appareil.
Les étalons A et B sont utilisés pour recalibrer la "master curve" en fonction tant de l'appareil utilisé que des réactifs à bord.
Pour effectuer la recalibration, analyser en trois répliques les deux étalons A et B et une seule fois les contrôles. Les valeurs de concentration obtenues avec les contrôles permettent de valider la nouvelle calibration.
Une fois que la recalibration de la "master curve" a été acceptée et mémorisée, tous les échantillons successifs peuvent être analysés sans calibration ultérieure, sauf dans les cas suivants:

- quand on charge à bord de l'appareil une cartouche réactifs avec un nouveau lot;
- quand les valeurs des contrôles ne rentrent pas dans l'intervalle d'acceptabilité;
- quand on effectue la procédure d'entretien de l'appareil;
- quand la validité de la "master curve" recalibrée est périmée.

La validité de la "master curve" recalibrée pour le kit *ZENIT RA GBM* est de 21 jours.
La gestion de la recalibration est mise en œuvre automatiquement par l'appareil.

Dosage

Appuyer sur la touche de mise en route.

1. Le système aspire 80 µL de Diluant Echantillons, 40 µL de Particules Magnétiques, 100 µL de Diluant Echantillons et 10 µL d'échantillon ou de contrôle (pour les étalons, le sérum positif est fourni prédilué avec le Diluant Echantillons et le volume prélevé est de 110 µL). Les solutions et la suspension aspirées sont distribuées dans la cuvette de réaction.
2. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37 °C pendant 10 minutes.
3. Après cette phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées.
4. Dans la cuvette est distribué 200 µL de conjugué.
5. La cuvette de réaction est incubée dans le rotor à 37 °C pendant 10 minutes.
6. Après cette phase d'incubation, les particules magnétiques sont séparées et lavées et la cuvette est transférée dans la chambre de lecture.
7. La quantité de conjugué lié à la phase solide, exprimée en RLU, est directement proportionnelle à la concentration en IgG anti-GBM se trouvant dans l'échantillon.
8. Les réponses obtenues sont interpolées sur la courbe de tarage et transformées en concentrations.

Les échantillons avec des valeurs de concentration plus élevées que la limite supérieure de mesurabilité peuvent être dilués et retestés. La nouvelle valeur obtenue est multipliée, pour obtenir le résultat final, par le facteur de dilution utilisé.

CONTROLE QUALITE

Pour assurer la validité du dosage, des sérums de contrôle de différents niveaux de concentration doivent être mesurés chaque jour où l'on réalise un dosage (au moins un sérum négatif et un sérum positif).
Si le laboratoire demande, pour la vérification des résultats du dosage, une utilisation plus fréquente ou un nombre plus important de contrôles, suivre les procédures du contrôle qualité qui y sont établies.
Si l'on utilise les sérums de contrôle ZENIT RA, les valeurs moyennes attendues et les limites d'acceptabilité sont celles reportées dans le DATA DISK se trouvant également dans l'emballage des contrôles.
Si l'on utilise des sérums de contrôle différents, il faut, avant leur première utilisation, définir les valeurs attendues avec les réactifs et le système ZENIT RA.
Quand la valeur des contrôles ne rentre pas dans la gamme d'acceptabilité spécifiée, les résultats relatifs du dosage ne sont pas valables et les échantillons respectifs doivent être retestés.
Dans ce cas, il faut suivre une procédure de recalibration avant la répétition du dosage.

CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Calcul des résultats

La concentration en anticorps IgG anti-GBM se trouvant dans les échantillons en examen est calculée automatiquement par le système. Les valeurs peuvent être visualisées à travers lecture sur l'écran ou par impression.
Les concentrations sont exprimées en UA/mL.
Le calcul de la concentration en analyte dans l'échantillon se fait à travers lecture de la réponse obtenue pour chaque échantillon sur une courbe de calibration élaborée à travers un système de "fitting" logistique à quatre paramètres (4PL, Y pondéré), corrigé périodiquement en fonction des réponses obtenues dans le dosage des étalons.

Pour des informations détaillées sur la façon dont le système calcule les résultats, consulter le manuel de fonctionnement du système.

Interprétation des résultats

La gamme de mesure du dosage *ZENIT RA GBM* est: 0.0 – 1000 UA/mL.
Les valeurs inférieures à 0.0 UA/mL sont des valeurs extrapolées, le message "OMR-"et/ou ORA apparaît et elles sont reportées avec valeur "égale à 0.0 UA/mL".
Les valeurs supérieures à 1000 UA/mL ont le message "OMR+" et/ou ORA et peuvent être retestées après dilution opportune.
Les résultats des échantillons peuvent être interprétés de la façon suivante:

(UA/mL)	Interprétation
<40	L'échantillon doit être considéré négatif pour la présence de IgG anti-GBM
≥ 40	L'échantillon doit être considéré positif pour la présence de IgG anti-GBM

Les valeurs reportées ci-dessus doivent être considérées comme des valeurs suggérées. Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles de référence.

LIMITES DU DOSAGE

Dans un but diagnostic, les résultats obtenus avec le kit *ZENIT RA GBM* et le système *ZENIT RA Analyzer* doivent être utilisés avec les autres données cliniques et de laboratoire à disposition du médecin.
La contamination bactérienne des échantillons et l'inactivation à la chaleur peuvent influencer le résultat du dosage.
Les anticorps hétérophiles se trouvant dans les échantillons de sérum humain peuvent réagir avec les réactifs à base d'immunoglobulines, causant des interférences dans les dosages immunologiques in vitro. Ces échantillons peuvent donner lieu à des valeurs anormales si analysés avec le kit *ZENIT RA GBM*.
Les échantillons de patients atteints d'hépatopathies chroniques, infections chroniques, collagénopathies et myélome avec hypergammaglobulinémie (concentration en IgG supérieure à 1800 mg/dL), dans certains cas, peuvent présenter des valeurs positives de IgG anti-GBM.

VALEURS ATTENDUES

On a analysé les échantillons de 100 patients sains pour vérifier la présence d'anticorps IgG anti-GBM.
Tous les échantillons analysés ont été négatifs, avec une valeur moyenne de 1.1 UA/mL et une déviation standard de 3.2 UA/mL.
Avec les résultats obtenus, on a calculé la "Limit of Blank" (LoB = la plus haute valeur qu'ils peuvent atteindre dans une série d'échantillons qui contiennent l'analyte). La "Limit of Blank", déterminée comme étant le 95° percentile de la population négative, est résulté égal à 6.3 UA/mL avec le lot de réactifs n° 2.

SENSIBILITE ET SPECIFICITE CLINIQUE

On a testé avec le kit ZENIT RA GBM un total de 156 échantillons dont 30 échantillons de patients atteints du syndrome de Goodpasture (GP), 2 échantillons de patients atteints de glomérulonéphrite à progression rapide (GNRP), 95 échantillons affectés de différentes pathologies (18 maladies du tissu conjonctif systémiques, 12 vasculites associées aux ANCA, 15 arthrites rhumatoïdes, 4 maladies coeliaques, 38 pathologies infectieuses, 8 pathologies diverses), 29 échantillons de sujets normaux.

Dans la population supposée négative (18 maladies du tissu conjonctif systémiques, 12 vasculites associées aux ANCA, 15 arthrites rhumatoïdes, 4 maladies coeliaques, 38 pathologies infectieuses, 8 pathologies diverses et 29 échantillons de sujets normaux) étudiée, aucun échantillon n'est résulté positif.

- **Spécificité diagnostique** : 100 % (intervalle de confiance à 95%: 96.3 - 99.9%); sur 124 échantillons, 124 sont apparus négatifs.

Dans la population supposée positive (30 échantillons de patients atteints du syndrome de Goodpasture (GP), 2 échantillons de patients atteints de glomérulonéphrite à progression rapide (GNRP)) étudiée, tous les échantillons étaient positifs.

- **Sensibilité diagnostique** : 100 % (intervalle de confiance à 95%: 86.7 - 99.7%); (32/32 échantillons).

Sur base des résultats de la spécificité et de la sensibilité diagnostique, l'accord diagnostique est de 100 % (intervalle de confiance à 95%: 96.7 - 99.9%); (156/156 échantillons).

PRESTATIONS

Avertissement: les données présentées ne représentent pas le fonctionnement du kit, mais constituent une preuve expérimentale de comment fonctionne le kit pour de tels paramètres de la façon prévue par la producteur.

Précision et Reproductibilité

La ***précision*** a été calculée en analysant les résultats de 20 réplicats de quatre sérums avec différentes concentrations (un négatif et trois positifs avec différentes concentrations en IgG anti-GBM) effectués avec deux différents lots de réactifs au cours de la même séance expérimentale.

La concentration du sérum anti-GBM négatif aux IgG (N4) était compris dans l'intervalle allant de 0.0 à 0.4 UA/mL avec le lot de réactif n° 2 et 0.0 UA/mL avec le lot de réactif n° 3.

Dans le tableau sont reportés les résultats obtenus avec les 3 sérums positifs.

Echantillon	Réactifs Lot. n°	Concentration moyenne (UA/mL)	DS (UA/mL)	CV %
P1	2	81.4	2.52	3.1
	3	64.7	2.07	3.2
P2	2	243.5	18.82	7.7
	3	270.9	11.88	4.4
P3	2	471.5	13.57	2.9
	3	371.9	12.06	3.2

La ***reproductibilité*** a été calculée en analysant les résultats de la détermination de six sérums (un négatif et cinq positifs avec différentes concentrations en IgG anti GBM) effectuée une seule fois, au cours de 14 séances différentes, avec un seul lot de réactif.

La concentration du sérum anti-GBM négatif aux IgG (GBM-N3) était comprise dans l'intervalle allant de 0.5 à 2.2 UA/mL.
Dans le tableau sont reportés les résultats obtenus avec les cinq sérums positifs.

Echantillon	Concentration moyenne (UA/mL)	DS (UA/mL)	CV %
GBM-P1	51.2	4.62	9.0
GBM-P2	205.0	15.06	7.3
GBM-P3	296.3	28.84	9.7
GBM-P4	91.6	7.16	7.8
GBM-P5	222.8	18.68	8.4

Linéarité des Dilutions

Pour évaluer la linéarité des dilutions du kit *ZENIT RA GBM,* on a dosé des dilutions scalaires de 3 sérums à concentration élevée en IgG anti-GBM, réalisées avec le Liquide Système.
Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau suivant.

Echantillon	Facteur de dilution	Concentration mesurée (UA/mL)	Concentration attendue (UA/mL)	Récupération %
1	1	338.0	--	(100)
	2	169.0	169.0	100.0
	4	83.2	84.5	98.5
	8	42.1	42.3	99.5
2	1	353.3	-	(100)
	2	173.0	176.7	97.9
	4	93.0	88.3	105.3
	8	42.7	44.2	96.6
3	1	223.6	-	(100)
	2	124.0	111.8	110.9
	4	67.4	55.9	121.0
	8	33.9	28.0	121.1

Il faut souligner que certains sérums, quand ils sont mesurés à des dilutions différentes, peuvent fournir des résultats non linéaires au sein de l'intervalle de mesure, le résultat dépendant non seulement de la concentration mais aussi de l'affinité des anticorps se trouvant dans l'échantillon.

Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique du kit *ZENIT RA GBM*, exprimée en tant que ***limite de détection*** *(Limit of Detection – LoD:* c'est à dire la plus petite quantité d'analyte que la méthode est capable de détecter*)* a été évaluée en utilisant la formule pour le calcul LoD = LoB + C_β SD_s (où LoB représente la valeur du "Limit of Blank", SD_s la déviation standard estimée de la distribution de l'échantillon à basse concentration et C_β est dérivé du 95 ° percentile de la distribution standard gaussienne).

On a utilisé 5 échantillons à basse concentration en analytes, déterminés en simple avec un lot de réactif au cours de 14 séances différentes.
La limite de détection du kit *ZENIT RA GBM* s'est révélée égale à 13.5 UA/mL.
Les valeurs de la limite de détection, ainsi que les considérations de caractère clinique et les résultats de comparaison avec des méthodes de référence ont contribué à la définition de la valeur de cut-off.

Spécificité Analytique: Interférences

Les prestations du dosage ne sont pas influencées par la présence dans l'échantillon de substances potentiellement interférentes reprises dans le tableau suivant, jusqu'à la concentration expérimentée.

Substances potentiellement interférentes	Concentration maximale testée
Bilirubine libre	20 mg/dL
Bilirubine conjuguée	20 mg/dL
Hémoglobine	1000 mg/dL
Triglycérides	3000 mg/dL

L'utilisation d'échantillons lipémiques, hémolysés ou troubles est toutefois déconseillée.

Spécificité Analytique: Réactions croisées

Pour évaluer les réactions croisées potentielles de l'antigène utilisé pour sensibiliser les microparticules, on a effectué une étude avec 49 échantillons, tous avec des niveaux élevés en autres anticorps et négatifs pour les anti-GBM IgG.
Les échantillons utilisés étaient subdivisés comme suit: CCP et/ou FR (15), Gliadine A et/ou G et/ou tTG-A (4), positifs aux ANCA (12) et aux ANA et/ou ENA (18).
L'étude n'a pas montré de réaction croisée significative de l'antigène en phase solide avec les autres auto-anticorps.

Effet saturation à hautes doses

Certaines méthodes immunologiques utilisées pour la détermination d'échantillons contenant l'analyte à des concentrations extrêmement élevées peuvent fournir des niveaux apparents d'analyte sous-estimés (Effet hook).
La méthode utilisée dans le kit *ZENIT RA GBM*, étant une méthode à deux incubations, ne subit pas cet effet.
Un échantillon avec une concentration extrêmement élevée (au-delà de l'intervalle de mesure) en IgG anti-GBM a confirmé l'absence d'effet "hook" jusqu'à la concentration de 1552 UA/mL.

Sensibilité et Spécificité Relative

La présence d'anticorps IgG anti-GBM a été déterminée en utilisant le kit ZENIT RA GBM et une méthode de dosage ELISA disponible dans le commerce chez 156 échantillons: 30 échantillons de patients atteints de syndrome de Goodpasture (GP), 2 échantillons de patients atteints de glomérulonéphrite à progression rapide (GNRP), 95 échantillons affectés de différentes pathologies (18 maladies du tissu conjonctif systémiques, 12

vasculites associées aux ANCA, 15 arthrites rhumatoïdes, 4 maladies coeliaques, 38 pathologies infectieuses, 8 pathologies diverses), 29 échantillons de sujets normaux.
5 échantillons ont donné lieu à des résultats discordants entre le dosage ZENIT RA et le dosage ELISA disponible dans le commerce.
La ***concordance relative*** est apparue égale à 96.8 % (intervalle de confiance à 95%: 92.3 - 98.8%); (151/156 échantillons).
La ***sensibilité relative*** est apparue égale à 90.9 % (intervalle de confiance à 95%: 74.5 - 97.6%); (30/33 échantillons).
La ***spécificité relative*** est apparue égale à 98.4 % (intervalle de confiance à 95%: 93.7 - 98.7%); (121/123 échantillons).
Les trois échantillons apparus négatifs avec le kit ZENIT RA GBM et positifs avec le kit ELISA appartenaient 1 au groupe des échantillons avec pathologies infectieuses, 1 au groupe des échantillons avec pathologies diverses et 1 au groupe des échantillons de sujets normaux.
Les deux échantillons positifs avec le kit ZENIT RA GBM et négatifs avec le kit ELISA appartenaient tous deux au groupe des échantillons avec syndrome de Goodpasture.

BIBLIOGRAPHIE

1. Salama AD, Levy JB, Lightstone, Pusey CD. Goodpasture's disease. Lancet 2001; 358: 917-20.

2. Lerner RA, Glassock RJ, Dixon FJ, The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. J Exp Med 1967; 126: 989-1004.

3. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. N Engl J Med 2003; 348: 2543-56.

4. Levy JB, Turner AN, Rees AJ, Pusey CD. Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma-exchange and immunosuppression. Ann Int Med 2001; 134: 1033-42.

5. Wilson CB, Dixon FJ. Diagnosis of immunopathologic renal disease. Kidney Int 1974; 5: 389-401.

6. Sinico RA, Radice A, Corace C, Sabadini E. Anti-glomerular basement membrane antibodies in the diagnosis of Goodpasture syndrome: a comparison of different assays. Nephrol Dial Transplant 2006; 21: 397-401.

7. Mahler M, Radice A, Sinico RA, Damoiseaux J, Seaman A, Buckmelter K et al. Performance evaluation of a novel chemiluminescence assay for detection of anti-GBM antibodies: an International multicenter study. Nephrol Dial Transplant 2012; 27 (1): 243-52.

8. Segelmark M, Hellmark T, Wieslander J. The prognostic significance in Goodpasture's disease of specificity, titre and affinity of anti-glomerular-basement membrane antibodies. Nephron Clin Pract 2003; 94: 59-68.

9. Hellmark T, Niles JL, Collins AB, McCluskey RT, Brunmark C. Comparison of anti-GBM antibodies in sera with or without ANCA. J Am Soc Nephrol 1997; 8: 376-85.

10. Levy JB, Hammad T, Coulthart A, Dougan T, Pusey CD. Clinical feature and outcome of patients with both ANCA and anti-GBM antibodies. Kidney Int 2004; 66: 1535-40.

TECHNOGENETICS S.r.l.
Via Vanvitelli, 4
20129 – Milan – Italie
Siège opérationnel: Via della Filanda, 26
26900 – Lodi – Italie

FRANCE

Distribué par
A. Menarini Diagnostics France S.A.R.L.
3-5, Rue du Jura - BP 70511- 94633 Rungis Cedex
Tel. +33 1 56 34 69 10 - Fax +33 1 56 34 69 11
www.menarinidiagnostics.fr

BELGIQUE et LUXEMBOURG

Distribué par
Menarini Diagnostics Benelux S.A./N.V.
Belgicastraat, 4 - 1930 Zaventem
Tel. +32 2 72 14 545 - Fax +32 2 72 09 292
www.menarinidiagnostics.be